

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭60-87225

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)5月16日

A 61 K 37/04  
9/70  
37/547  
A 61 L 15/00

7138-4C  
6742-4C  
7138-4C  
6779-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 ファイブリン形成促進材料の製造法

⑰ 特 願 昭58-196830

⑱ 出 願 昭58(1983)10月18日

⑲ 発 明 者 阪 本 泉 京都市伏見区桃山町大島38-335  
⑲ 発 明 者 雲 丹 亀 司 宇治市宇治琵琶16  
⑲ 発 明 者 高 木 邦 彦 宇治市宇治野神1-102  
⑲ 出 願 人 ユニチカ株式会社 尼崎市東本町1丁目50番地

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ファイブリン形成促進材料の製造法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 酸化セルロースを素材とした繊維集合体、スポンジ、粉末、モノフィラメント、フィルム、マイクロカプセル等の形状を有する構造物を中和した後、該構造物に血液凝固第XⅢ因子及びトロンビンを固定化することを特徴とする長時間有効に安定化フィブリンの生成を促進し得るファイブリン形成促進材料の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、切傷、擦傷等の傷口、火傷による創面、手術創面、体表面に生じた潰瘍、抜歯窩等の創傷部の治療又は血管閉塞療法に用いられる塞栓材料又は穿刺療法に用いられる注入材料に関し、さらに詳しくは長時間有効に安定化フィブリンの生成を促進しうるファイブリン形成促進材料に関する。

本発明者らは、血液凝固第XⅢ因子(以降「F

XⅢ」と略記する。)及びトロンドを固定化した材料については、トロンドのみを固定化した材料すなわち非安定化フィブリンの形成のみを促進する材料に比べて安定化フィブリンの形成を促進し得るため創傷部治療用材料として優れていることを見出し、先に提案した(特開昭55-58163号)が、引続き一般に止血剤としてよく使用されているところの酸化セルロースを素材として用いるべく研究を続けたところ、酸化セルロースをそのままFXⅢとトロンビンの固定化に用いると、安定化フィブリンの生成促進に悪影響を及ぼすことが判明した。

本発明者らは、かかる現況に鑑み、上記ごとくの問題点を解消すべく、引続き検討を重ねた結果酸化セルロースを中和した後FXⅢとトロンビンを固定化すれば安定化フィブリンの形成促進能力は良好に保たれることを見出し、本発明に到達したものである。

すなわち、本発明は酸化セルロースを素材とした繊維集合体、スポンジ、粉末、モノフィラメン

ト、フィルム、マイクロカプセル等の性状を有する構造物を中和した後、該構造物にFXⅢとトロンビンとを固定化することを特徴とする長時間有効に安定化フィブリンの生成を促進し得るフィブリン形成促進材料の製造法である。

これまでに、酸化セルロースを中和してから固定化の担体として用いることに関しては、例えば米国特許第 2,517,772号明細書に、酸化セルロースを一部中和してからトロンビン処理を行うことにより、トロンビンの失活を防ぎうるが示されている。しかるに、酸化セルロースをFXⅢで処理したごとくの前例はなく、さるには本発明のごとくに安定化フィブリン形成促進能力を考慮した前例などは全くない。

本発明に用いる酸化セルロースとは、例えばウッドパルプ、綿、綿リクター、ラミー、ジュート紙、ヘムプ、再生セルロース、レーヨン等のセルロース材料をオゾン、過酸化水素、過ヨウ素酸塩、二酸化窒素等を用いて公知の方法にて酸化したものをいうが、本発明においては、セルロースの-

$\text{CH}_2\text{OH}$  基の10~30%が-COOH基に酸化されたものが生体吸収性良好のため好ましく用いられ、15~25%のものが特に好ましく用いられる。

本発明においては、かかる酸化セルロースを中和して用いるが、ここにいる中和とは酸化セルロースの-COOHなる酸基を塩に変換させることを意味する。中和を行うには、酸化セルロースを例えばナトリウムやカルシウム等の金属の水酸化物やあるいはナトリウム、カルシウム、アンモニウム等の各種の塩、例えばアセテート塩やカーボネート塩にて酸化セルロースを処理すればよい。中和の度合は、過ぎれば構造物は水溶性となり固定化しにくくなり、一方、足らずは良好な徐放性を得ることができにくくなるので、構造物がゲル状となってその形を失う手前に行うのが好ましく、その目安としては、中和された酸化セルロースを水中に浸漬した際のpHが3~7、好ましくは5~6の間になるように中和を行うのが好ましい。中和は、構造物について行ってよいし、構造物に加工する前の素材を中和してから構造物としても

- 3 -

よい。

本発明に用いるトロンドは、フィブリンノーゲンをフィブリンに転化することができる蛋白分解酵素である。トロンビンは、人、牛、豚等の血液より分解されるが、人の治療に適用する場合には人トロンビンを用いるのが好ましい。

本発明に用いるFXⅢはフィブリン安定化因子と呼ばれ、非安定化フィブリンに直接作用し、フィブリン分子間のイソペプチド結合の生成に関与する因子である。FXⅢは人、牛等の血液あるいは胎盤より分離されるが、人の治療に適用する場合には人由来のFXⅢを用いるのが好ましい。

FXⅢ及びトロンビンは、中和した酸化セルロースに結合させるか、又は吸着させることにより固定化することができる。結合させるには、例えばO. Zaborsky, "Immobilized Enzymes" CRC Press, 1973に記載されているような従来より公知の共有結合やイオン結合法を採用することができる。

中和した酸化セルロースにFXⅢおよびトロン

- 5 -

- 4 -

ビンを共有結合させるには、ジシクロヘキシルカーボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)-カーボジイミド-メトールエンスルホネート等の脱水縮合剤を用いる方法、酸化セルロースをグルタルアルデヒド、ジアルデヒドでんぶん等のポリアルデヒドにより処理して、ホルミル基を導入した後FXⅢ及びトロンビンにより処理する方法、ポリアルデヒドの代わりにブロムシアンによりイミノカーボネート基、プロモアセチル基、無水マレイン酸共重合体等のポリ無水マレイン酸により酸無水物基、トルエンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソシアネート等のポリイソシアナートによりイソシアナート基、エチレングリコール、テトラメチルグリコール、グリセリン等のポリグリシジル誘導体等によりエポキシ基、塩化シアヌルによりクロルトリアジニル基を構造物に導入することができるので、これらの共有結合を形成うる官能基を用いてFXⅢ及びトロンビンを結合させる方法等を採用することができる。

- 6 -

中和した酸化セルロースにFⅩⅢ及びトロンビンをイオン結合させるには、酸化セルロースのもつカルボキシル基を利用してもよいし、また上記のごとくホルミル基、イミノカーボネート基、ブromoアセチル基、酸無水物基、イソシアネート基、エポキシ基、クロルトリアジニル基が導入された酸化セルロースは、ポリエチレンイミン等のポリアミンにより処理することによりアミノ化され、グリシン等のアミノカルボン酸により処理することによりカルボキシル化されるので、このようにしてイオン交換基であるアミノ基、カルボキシル基が導入された構造物にFⅩⅢ及びトロンビンをイオン結合させることができる。

中和した酸化セルロースにFⅩⅢ及びトロンビンを物理的吸着法や包括法等により吸着する場合には次のようにして行うことができる。すなわち中和した酸化セルロースを湿潤しうる溶媒にFⅩⅢ及びトロンビンを溶解し、この溶液により構造物を処理することによりFⅩⅢ及びトロンビンを物理的に吸着することができる。包括法はFⅩⅢ及

びトロンビンをゲルの細微な格子の中に包み込んで脱離できないようにする方法である。

上記のいずれの方法によりFⅩⅢ及びトロンビンを固定化する場合も、FⅩⅢ及びトロンビンを同時に固定化してもよいし、あるいは先にFⅩⅢを固定化しておいてから、引き続きトロンビンを固定化してもよいし、その逆であってもよい。また、FⅩⅢを固定化したものとトロンビンを固定化したものを別個に製造しておき、これらを均一に混合したり、積層したりしてもよい。

また、本発明の材料の製造に際しては、構造物にFⅩⅢの活性化に關与するカルシウムイオンを固定化することができる。さらに、本発明の材料の製造に際しては、必要に応じてFⅩⅢ及びトロンビンとともに構造物にアンチプラスミン剤、殺菌剤、抗生物質、ホルモン等の医薬品を構造物に固定化することができる。アンチプラスミンは、フィブリン溶解酵素であるプラスミンの阻害剤であり、したがってプラスミンを阻害することによりフィブリン溶解活性、すなわち線維素溶解活性

- 7 -

を抑制する。したがって、FⅩⅢ及びトロンビンとともにアンチプラスミンが固定化された材料は線維素溶解活性を抑制することによりフィブリンの生成を促進することができる。アンチプラスミンとしては、例えばウシの肺臓より抽出されるアプロチニン、微生物の培養液から分離されるペプスタチン、ロイペブシン、アンチバイン、キモスタチン等の天然物質、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、トラネキサム酸、メシル酸ガベキサートがあげられるが、特に $\epsilon$ -アミノカプロン酸、トラネキサム酸が好適に用いられる。

本発明の材料は、切傷、擦傷等の傷口、火傷による創面、体表面に生じた潰瘍、抜歯窩、吻合部等の創傷部の保護又は血管閉塞療法に用いられる塞栓材料や穿刺療法に用いられる注入材料に用いられ、長期間有効に安定化フィブリンの生成を促進することができる。したがって、本発明の材料が創傷部保護剤として用いられた場合は、創傷の治療を著しく早めると同時に局所の痛みを和らげる硬化があり、また塞栓物質として用いられた場

- 9 -

- 8 -

合は、迅速かつ強固に血栓を形成し、血管の再開通が起こらず、また注入材料として用いられた場合には迅速かつ確かな止血を可能とする。

以下、実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。なお、トロンビンとしては株式会社ミドリ十字の人の血漿トロンビンを、FⅩⅢとしてはFⅩⅢ濃縮乾燥製剤を用いた。FⅩⅢ製剤は1ビン当り新鮮人血漿4ml中に存在する量の60倍に相当するFⅩⅢ活性を有する。

また、安定化フィブリンの形成能試験は次のようにして行った。すなわち、FⅩⅢ及びトロンビンを固定化した構造物を固定化直後及び12ヵ月後において $Ca^{++}$ を含む水溶液により処理してFⅩⅢを活性化せしめたのち、その構造物を0.5%フィブリンノーゲン水溶液に投入し、37℃で10分間放置した。しかるのち、構造物表面に生成したフィブリンが安定化フィブリンか否かを確認した。非安定化フィブリンは1%モノクロル酢酸に溶解するが安定化フィブリンは1%モノクロル酢酸に溶解しないので、上記のようにして形成されたフィブ

- 10 -

リン膜の1%モノクロル酢酸に対する溶解製を調べることによりその確認を行った。

#### 実施例 1

オキシセル綿（酸化セルロース綿型、三共株式会社）20mgを0.5M酢酸カルシウム水溶液20ml中に室温にて2時間浸漬したのち、エタノール及び水にて洗浄し、風乾を行って中和オキシセル綿を得た。

このものの全量をフィブログミン水溶液（血液凝固第XⅢ因子の濃縮乾燥製剤、ヘキスト株式会社1ピンを水4mlに溶解したもの）2ml及びトロニン（ヒトトロニンミドリ、ミドリ十字株式会社、1ピンを水5mlに溶解したもの）2mlからなる混合液に、0℃にて2分間浸漬した後、-60℃で凍結乾燥を24時間行ってフィブログミンとトロニンの固定化された固定化中和オキシセル綿を得た。

このようにして得られた固定化中和オキシセル綿を用いて、固定化直後及び12ヵ月経過後において前述のフィブリン形成能試験を行ったところ、

表面に形成されたフィブリンは両者とも1%モノクロル酢酸に不溶な安定化フィブリンであった。また、安定化フィブリンの形成速度及び形成量に関しては固定化直後及び12ヵ月経過後とも同様に迅速かつ多量であった。

#### 比較例 1

酢酸カルシウム水溶液による処理を行わなかった以外は、実施例1と全く同様にして固定化オキシセル綿を得た。

このものを用いて固定化直後及び12ヵ月経過後において実施例1と同様のフィブリン形成能試験をおこなったところ、固定化直後においては安定化フィブリンは形成されたが、実施例1の試験と比較して形成速度は遅く、形成量も少なかった。また、12ヵ月経過後においてはフィブリンは形成されたが1%モノクロル酢酸に可溶の非安定化フィブリンであり、FXⅢの活性が失われていることがわかった。

特許出願人 ユニチカ株式会社

T8089

Allen Translation Service  
Translated from Japanese

1

(19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)

(11) Japanese Unexamined Patent Application **(Kokai)**  
**No. 60-87225**

## (12) Official Gazette for Unexamined Patent Applications (A)

(51) Int.Cl.<sup>4</sup> Ident. Symbols Internal Office Nos. (43) Disclosure Date: 16 May 1985

A 61 K	37/04	7138-4C
	9/70	6742-4C
	37/547	7138-4C
A 61 K	15/00	6779-4C

Request for Examination: Not yet requested Number of Inventions: 1 (Total of 4 pages)

(54) Title of the Invention: A Method for the Manufacture of a Fibrin Formation Promoting Material

(21) Application No.: 58-196830

(22) Application Date: 18 October 1983

(72) Inventor: Izumi Sakamoto, 38-335 Oshima, Momoyama-cho, Fushimi-ku, Kyoto-shi

(72) Inventor: Tsukasa Uniki, 16 Uji Biwa, Uji-shi

(72) Inventor: Kunihiro Takagi, 1-102 Uji Nokami, Uji-shi

(71) Applicant: Unitika Company, Ltd., 50 Higashi Hon-machi 1-chome, Amagasaki-shi

## Specification

## 1. Title of the Invention:

A Method for the Manufacture of a Fibrin Formation Promoting Material

## 2. Claim

(1) A method for the manufacture of a fibrin formation promoting material that effectively promotes production of stabilized fibrin over a long period characterized in that a structure having the shape of a fiber aggregate made of oxidized cellulose, a sponge, powder, monofilament, film or microcapsule is neutralized, after which blood coagulation factor XIII and thrombin are immobilized in said structure.

## 3. Detailed Description of the Invention

This invention relates to a plug material that is used in the treatment of ulceration that develops on wounds such as cuts and scratches, wound surfaces due to burns, surgical wound surfaces and body surfaces and wounds such as tooth extraction cavities, in the treatment of blood vessel obstruction or as injection materials that are used in the treatment of punctures. In greater detail, it relates to fibrin formation promoting material that effectively promotes the formation of stabilized fibrin over long periods.

The inventors discovered that materials in which blood coagulation factor XIII (hereafter abbreviated as FXIII) and torondo [phonetic and probably a misprint for thrombin] are immobilized are superior as materials for wound treatment

for promoting stabilized fibrin formation to materials in which only torondo [sic] is immobilized, i.e., to materials that promote only unstabilized fibrin formation. Although proposed previously (Japanese Patent Application Early Disclosure No. 55-58163 [1980], research was then continued on the use of oxidized cellulose, which is generally used as a hemostatic agent. When this was done, it was ascertained that there was a deleterious effect on promotion of stabilized fibrin production when oxidized cellulose was used in unaltered form in the stabilization of FXIII and thrombin.

In view of the existing situation, the inventors conducted repeated studies for the purpose of eliminating the problems described above. As a result, they perfected this invention by discovering that the capacity for stabilized fibrin production was well maintained when the oxidized cellulose was neutralized and FXIII and thrombin were then immobilized.

Specifically, this invention is a method for the manufacture of a fibrin formation promoting material that effectively promotes production of stabilized fibrin over a long period characterized in that a structure having the shape of a fiber aggregate made of oxidized cellulose, a sponge, powder, monofilament, film or microcapsule is neutralized, after which blood coagulation factor XIII and thrombin are immobilized in said structure.

## Unexamined Patent Application (Kokai) No. 60-87225 (2)

Up to this point, it had been indicated, for example, in U.S. Patent No. 2,517,772 in regard to the use of oxidized cellulose as a stabilized carrier after its neutralization, that deactivation of thrombin can be prevented by performing thrombin treatment after oxidized cellulose has been partially neutralized. There have been no previous examples of treating oxidized cellulose with FXIII, and, moreover, there have been no previous examples whatsoever taking into consideration the capacity for promotion of stabilized fibrin production as in this invention.

The term oxidized cellulose that is used in this invention refers to cellulose that has been obtained by oxidizing cellulose materials such as, for example, wet pulp, cotton, cotton linter, ramie, jute paper, hemp, regenerated cellulose and rayon by known methods using ozone, hydrogen peroxide, periodates and nitrogen dioxide. In this invention, it is desirable to use cellulose in which 10 to 30% of the  $-CH_2OH$  group have been oxidized to  $-COOH$  groups for the sake of better absorption capacity in the body, with the use of cellulose in which 15 to 25% have been oxidized being particularly desirable.

In this invention, such oxidized cellulose is used after having been neutralized. The term neutralization that is used here means that the  $-COOH$  acid group of the oxidized cellulose is converted to a salt. In performing neutralization, the oxidized cellulose may be treated to convert the oxidized cellulose, for example, to an hydroxide of a metal such as sodium or calcium to various salts such as sodium, calcium or ammonium salts, for example, acetate or carbonates. When the degree of neutralization is excessive, the structure becomes water-soluble and immobilization does not readily occur. On the other hand, when it is insufficient, good gradual release capacity cannot readily be obtained. Therefore, it is desirable to perform it out of consideration for the structure becoming gel-like and losing its shape. The standard is to perform neutralization so that the pH of the oxidized cellulose that has been neutralized when it is immersed in water is between 3 to 7, and, preferably, between 5 and 6. Neutralization may be performed on the structure or the material may be neutralized before processing, after which a structure may be made.

The torondo [phonetic] that is used in this invention is a proteolytic enzyme that can convert fibrinogen to fibrin. Thrombin is decomposed by blood in humans, cows and pigs. When it is used for the treatment of humans, it is desirable to use human thrombin.

The F XIII that is used in this invention is called fibrin stabilizing factor. It is a factor that acts directly on unstabilized fibrin and that contributes to the production of isopeptide bonds between fibrin molecules. FXIII is

separated from the blood or placenta of humans and cows. However, when it is used for treatment of humans, it is desirable to use FXIII originating from humans.

FXIII and thrombin can be bonded with the oxidized cellulose that has been neutralized or it can be immobilized by adsorption. For bonding, conventional, known covalent bonding or ionic bonding methods as described, for example, O. Zaborsky, "Immobilized Enzymes," CRC Press, 1973, can be used.

Methods for covalently bonding FXIII and thrombin to oxidized cellulose that has been neutralized that can be used include a method in which a dehydration condensation agent such as dicyclohexylcarbodiimide and 1-dicyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carboamidomethyltoluene sulfonate is used, a method in which the oxidized cellulose is treated with a polyaldehyde such as glutaraldehyde or dialdehyde starch and a formyl group is introduced, after which treatment is performed with FXIII and thrombin and a method in which, instead of polyaldehydes, iminocarbonate groups and bromoacetyl groups can be introduced into the structure by bromoamines, acid anhydrides by polymaleic anhydrides such as maleic anhydride copolymers, isocyanate groups by polyisocyanates such as toluene diisocyanate and hexamethylene diisocyanate, epoxy groups by polyglycidyl derivatives such as ethylene glycol, tetramethyl glycol and glycerol and chlorotriazinyl groups by cyanuric chloride, with FXIII and thrombin being bonded using functional groups that can form covalent bonds with them.

The carboxyl groups of the oxidized cellulose may be used to bond FXIII and thrombin to oxidized cellulose that has been neutralized. In addition, oxidized cellulose into which formyl groups, iminocarbonate groups, bromoacetyl groups, acid anhydride groups, isocyanate groups, epoxy groups and chlorotriazinyl groups are introduced, can be aminated by treatment with a polyamine such as polyethyleneimine and can be carboxylated by treatment with an aminocarboxylic acid such as glycine. Therefore, FXIII and thrombin can be ionically bonded to structures into which amino groups and carboxyl groups, which are ion exchange groups, have been introduced in this way.

When FXIII and thrombin are adsorbed by physical adsorption methods or inclusion methods to oxidized cellulose that has been neutralized, this can be performed as follows. Specifically, the FXIII and thrombin are dissolved in solvent that can moisten oxidized cellulose that has been neutralized and the

## Unexamined Patent Application (Kokai) No. 60-87225 (3)

FXIII and thrombin can be physically adsorbed by treating the structure with this solution. The inclusion method is a method in which the FXIII and thrombin are wrapped in a fine gel lattice so that they cannot be eliminated.

When FXIII and thrombin are immobilized by either of the aforementioned methods, the FXIII and thrombin may be immobilized at the same time or the FXIII may be immobilized first, after which the thrombin may be immobilized. The order may also be reversed. In addition, immobilized FXIII and immobilized thrombin may be manufactured separately and they can then be mixed or laminated.

Further, at the time of manufacture of the materials of this invention, calcium ions that participate in activation of FXIII can be immobilized in the structure. In addition, as required, at the time of manufacture of the materials of this invention, medicinal drug products such as antiplasmin agents, bactericidal agents, antibiotics and hormones can be immobilized in the structure together with FXIII and thrombin. Antiplasmins are inhibitors of plasmin, which is a fibrinolytic enzyme. Consequently, fibrinolytic activity, that is, cellulose dissolving activity, is controlled by inhibiting plasmin. Consequently, materials in which FXIII and thrombin are immobilized together with an antiplasmin can promote production of fibrin by inhibiting fibrinolytic activity. Antiplasmins that can be used appropriately include, for example, natural substances such as aprotinin, which is extracted from the lungs of cattle, pepstatin, leupeptin, antivenin [phonetic]\* and chymostatin [phonetic], which are separated from culture solutions of microorganisms,  $\epsilon$ -aminocaproic acid, tranexamic acid and mesyl acid carbexate [phonetic -- Could be a Misprint]. Of these,  $\epsilon$ -aminocaproic acid and tranexamic acid are the most desirable.

The materials of this invention can be used in the treatment of ulceration that develops on wounds such as cuts and scratches, wound surfaces due to burns, surgical wound surfaces and body surfaces and wounds such as tooth extraction cavities, in the treatment of blood vessel obstruction or as injection materials that are used in the treatment of punctures and can promote stabilized fibrin formation effectively over long periods. Consequently, when the materials of this invention are used as wound protective agents, cure of the wound is markedly accelerated, and, at the same time, local pain is mitigated and hardening occurs. In addition, when they are used as plug substances, a plug is formed rapidly and securely and re-opening of the blood vessel does not occur. When they are used as injection materials, rapid and reliable hemostasis becomes possible.

We shall now present examples in order to describe this invention more specifically. Human plasma thrombin produced by the Green Cross Company, Ltd., was used as the thrombin and FXIII condensed and dried agent was used as the FXIII. The FXIII preparation had FXIII activity corresponding to 60 times the quantity present in 4 ml of fresh human plasma per vial.

The stabilized fibrin formation capacity tests were performed as follows. Specifically, the structure in which FXIII and thrombin had been immobilized was treated with an aqueous solution containing  $\text{Ca}^{++}$  immediately after and 12 months after immobilization to activate the FXIII, after which the structure was introduced into a 0.5% fibrinogen aqueous solution and the materials were allowed to stand for 10 minutes at 37°C. Following that, it was confirmed as to whether or not the fibrin that was produced on the surface of the structure was stabilized fibrin. Unstabilized fibrin was dissolved in 1% monochloroacetic acid whereas stabilized fibrin does not dissolve in 1% monochloroacetic acid. Therefore, confirmation is performed by preparing a solution preparation of 1% monochloroacetic acid for the fibrin film that has been described above.

#### Example 1

20 ml of Oxidel [phonetic] Cotton (oxidized cellulose cotton product manufactured by the Sankyo Company, Ltd.) was immersed for 2 hours at room temperature in 20 ml of 0.5 M aqueous solution of calcium acetate, after which it was washed with ethanol and water and air dried, with neutral Oxidel cotton being obtained.

The total quantity of this product was immersed for 2 minutes at 0°C in a mixed solution comprised of 2 ml of Fibrogammin (concentrated, dried preparation of blood coagulation factor XIII manufactured by the Hoechst Company, Ltd.; 1 vial of which is dissolved in 4 ml of water) and 2 ml of thrombin (Human Thrombin Green, manufactured by the Green Cross Company, Ltd.; 1 vial of which is dissolved in 5 ml of water), after which freeze-drying was performed at -60°C for 24 hours and immobilized. Neutral Oxidel cotton in which Fibrogammin and thrombin are immobilized was obtained.

When the fibrin formation capacity test described above was performed immediately and 12 months after immobilization using the immobilized, neutral Oxidel cotton obtained as described above, both fibrin samples that were formed on the surface were stabilized fibrin

\*Translator's Note: Transliterated phonetically from the Japanese. As such, the spelling may differ from other transliterations.

## Unexamined Patent Application (Kokai) No. 60-87225 (4)

that was insoluble in 1% monochloroacetic acid. In a study of the formation speed and quantity of formation of stabilized fibrin, similar speeds and large quantities were found immediately after and 12 months after immobilization.

**Comparative Example 1**

Immobilized Oxigel cotton was obtained in exactly the same way as in Example 1 except that the treatment with aqueous solution of calcium acetate was not performed.

When the same fibrin formation capacity tests as in Example 1 were performed immediately and 12 months after immobilization using this product, stabilized fibrin was formed immediately after immobilization. However, formation speed was slower and the quantity of formation was less than in the test performed in Example 1. Further, although fibrin was formed after 12 months, it was found that it was unstabilized fibrin that was soluble in 1% monochloroacetic acid and that the activity of FXIII was lost.

Applicant: Unitika Company, Ltd.